

**УКРАЇНА**

(19) **UA** (11) **89758** (13) **U**
 (51) МПК (2014.01)
C12P 21/00
A23J 3/34 (2006.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ
 УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 14817	(72) Винахідник(и):
(22) Дата подання заявки: 17.12.2013	Юкало Володимир Глібович (UA),
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2014	Сторож Людмила Анатоліївна (UA), Рибак Ольга Миколаївна (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2014, Бюл.№ 8	(73) Власник(и):
	ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ПУЛЮЯ, вул. Руська, 56, м. Тернопіль, 46001 (UA)

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОПЕПТИДІВ ІЗ КАЗЕЇНУ КОРОВ'ЯЧОГО МОЛОКА**(57) Реферат:**

Спосіб виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока, що передбачає протеоліз білків під дією ензимного препарату (панкреатину або трипсину) та осадження фосфопептидів із гідролізату етанолом при підвищеній концентрації іонів Ca^{2+} у розчині, причому протеолізу піддають лише суміш α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, яку попередньо відділяють від загального казеїну коров'ячого молока.

UA 89758 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології і може бути використана для одержання фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока як функціональна добавка у виробництві харчових продуктів.

Найбільш близьким технічним рішенням до запропонованого є спосіб одержання фосфопептидів із казеїну молочного білка, який передбачає протеоліз білка під дією ензимних препаратів та осадження фосфопептидів із гідролізату етанолом при підвищеній концентрації іонів Ca^{2+} [Milk Protein., edited by W. L. Hurley. - InTech. - 2012. - 340 p].

До недоліків даного способу отримання фосфопептидів можна віднести необхідність протеолізу загального казеїну молока, що спричинює утворення значної кількості гідролізату, нераціональне використання цінної сировини, яка може бути використана як попередник багатьох біологічно активних пептидів.

В основу корисної моделі поставлена задача розроблення способу виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока, що надасть можливість підвищити вихід фосфопептидів під час протеолізу фосфопротеїнів, відокремити основні фракції казеїну для отримання інших видів біологічно активних пептидів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока передбачає протеоліз білків під дією ензимного препарату (панкреатину або трипсину) та осадження фосфопептидів із гідролізату етанолом при підвищеній концентрації іонів Ca^{2+} у розчині, причому протеолізу піддають лише суміш α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, яку попередньо відділяють від загального казеїну коров'ячого молока.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю запропонованих ознак та очікуваним технічним результатом полягає у наступному.

Фосфопептиди казеїну, у більшості випадків, виділяють шляхом протеолізу загального казеїну, який, як відомо, складається із таких фракцій як α_{S1} -казеїн, α_{S2} -казеїн, β -казеїн, κ -казеїн у середній кількості 40, 10, 38, 12 %, відповідно. При цьому казеїнові фракції відрізняються за амінокислотним складом і кількістю фосфосеринових груп. Так, α_{S1} -казеїн у своєму складі містить 8 (основиний α_{S1} -) або 9 (мінорний α_{S0} -) фосфосеринових груп, α_{S2} -казеїн - від 10 до 13 таких груп, β -казеїн - 5, κ -казеїн - 1. Наявність фосфосеринових груп обумовлює ряд важливих властивостей казеїнів, зокрема їх здатність зв'язувати значну кількість іонів Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , брати участь у їхньому транспортуванні і засвоєнні в організмі людини.

Фосфопептиди різних казеїнових фракцій можуть відрізнятися своїми функціональними властивостями і біологічною дією на організм людини. Окрім того, фракція κ -казеїну, до складу якої входить лише одна фосфосеринова група, є більш перспективною для отримання біоактивних пептидів, таких як казоплателіни, казокініки, казоксини, імуномодулятори, а ніж фосфопептидів.

Тому з метою раціонального використання усіх фракцій казеїну й отримання біологічно активних речовин із визначеними функціональними властивостями доцільно здійснювати протеоліз окремих казеїнових фракцій.

Спосіб виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока здійснюють таким чином. З незбираного коров'ячого молока сепаруванням отримують знежирене молоко. Сепарування проводять двічі за температур -30 і 4 °C, що дозволяє більш повно видалити ліпіди молока без втрати білків. Із знежиреною молоком виділяють сироваткові білки у процесі коагуляції казеїну хлоридною (сульфатною, молочною, оцтовою) кислотою в ізоелектричній точці при pH 4,6. Осад, що утворюється під час коагуляції, після промивання у дистильованій воді, розчиняють у розчині гідроксиду натрію до pH не вище 7,5. Після повторної коагуляції і промивання казеїнового осаду проводять інактивацію природних протеаз молока шляхом екстракції казеїну в оцтовій кислоті при pH 4,0 впродовж 5 год.

Для виділення суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів в, сухий казеїн розчиняють у розчині сечовин (3,3 М) при pH 4,5-4,7. При цьому β -казеїн переходить у розчинний стан, а інші казеїни (а α_{S1} -, α_{S2} -, κ -казеїн) коагулюють. Утворений осад промивають дистильованою водою, розчиняють у розчині гідроксиду натрію (до pH не вище 7,5) та повторно осаджують для повної очистки від β -казеїну. Відділення суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів від κ -казеїну проводять шляхом коагуляції у присутності високих концентрацій Ca^{2+} та одночасним нагріванням середовища до 30 °C протягом 30 хв.

Протеоліз суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів проводять за температури 37 °C і pH 7,9. Кількість ензимного препарату (панкреатину або трипсину) становить 5 % від кількості суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів. Для досягнення необхідного ступеня протеолізу тривалість процесу повинна становити не менше як 3 год..

Перед виділенням фосфопептидів із гідролізату попередньо відділяють нерозщеплені протеїни при pH 4,6 шляхом центрифугування. Для осадження фосфопептидів очищений гідролізат змішують з 10 %-м розчином хлориду кальцію у співвідношенні 9:1 (гідролізат:розчин

хлориду кальцію) та з наступним додаванням етанолу у співвідношенні 1:1 (суміш:етанол). Отриманий осад фосфопептидів повторно промивають етанолом та висушують.

Приклад конкретного виконання способу

Виділення казеїну проводять із знежиреного коров'ячого молока шляхом коагуляції в ізоелектричній точці при рН 4,6. При цьому інактивацію природних протеаз забезпечують інкубацією в оцтовій кислоті. Відокремлення казеїнових фракцій із загального казеїну здійснюють диференційною коагуляцією. Протеоліз проводять за температури 37 °С і рН 7,9 протягом не менше як 3 год. Для виділення фосфопептидів гідролізат змішують з 10 %-м розчином хлориду кальцію у співвідношенні 9:1 та з наступним додаванням етанолу у співвідношенні 1:1 (суміш: етанол).

Ефективність даного способу виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока розкривається за допомогою наступних прикладів і таблиці.

Приклад 1 (прототип). Для виділення фосфопептидів здійснюють протеоліз загального казеїну із застосуванням різних видів ензимних препаратів.

Приклад 2. Для виділення фосфопептидів здійснюють протеоліз суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, виділеної диференційною коагуляцією, із застосуванням різних видів ензимних препаратів.

Приклад 3. Для виділення фосфопептидів здійснюють протеоліз β -казеїну, виділеного диференційною коагуляцією, із застосуванням різних видів ензимних препаратів.

Таблиця

Вихід фосфопептидів (% до початкової кількості білка)

Ензимний препарат	панкреатин	хімотрипсин	трипсин	папаїн	нейтральна протеаза
Приклад 1 (прототип)	11,50-12,05	9,67-10,22	10,89-11,70	7,94-8,61	9,00-9,33
Приклад 2	13,67-14,22	10,28-10,83	12,89-13,44	8,67-9,22	9,33-9,78
Приклад 3	8,17...8,50	7,50-7,94	7,17-7,61	5,06-5,50	7,17-7,50

Технічний результат полягає у розробленні способу виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока, який передбачає на першому етапі - відділення від загального казеїну суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, а на другому - одержання фосфопептидів шляхом протеолізу суміші α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів з подальшим осадженням отриманого гідролізату етанолом при підвищеній концентрації іонів Ca^{2+} у розчині. Данин спосіб забезпечує підвищення виходу фосфопептидів, а також раціональне використання казеїнових фракцій для отримання біологічно активних пептидів із функціональними властивостями з метою подальшого їх використання у виробництві харчових продуктів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока, що передбачає протеоліз білків під дією ензимного препарату (панкреатину або трипсину) та осадження фосфопептидів із гідролізату етанолом при підвищеній концентрації іонів Ca^{2+} у розчині, який **відрізняється** тим, що протеолізу піддають лише суміш α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, яку попередньо відділяють від загального казеїну коров'ячого молока.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601